

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2004 Thomson Derwent. All rts. reserv.

009887578

WPI Acc No: 1994-167493/199420

XRAM Acc No: C94-076827

**Probe for detection of infectious disease - comprises DNA fragment
specific for fungal disease agent, for diagnosis of e.g. Candida
infection**

Patent Assignee: FUSO PHARM IND LTD (FUSO); OHNO T (OHNO-I); FUSO YAKUHI
KOGYO KK (FUSO); ONO Y (ONOI-I)

Inventor: HIROTSU T; KESHI H; MATSUHISA A; OHNO T

Number of Countries: 023 Number of Patents: 010

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
WO 9410341	A1	19940511	WO 93JP1555	A	19931025	199420 B
JP 6133798	A	19940517	JP 92285802	A	19921023	199424
AU 9453445	A	19940524	WO 93JP1555	A	19931025	199434
			AU 9453445	A	19931025	
EP 670373	A1	19950906	EP 93923652	A	19931025	199540
			WO 93JP1555	A	19931025	
JP 2558420	B2	19961127	JP 92285802	A	19921023	199701
AU 680451	B	19970731	AU 9453445	A	19931025	199738
<i>cm</i> <u>US 5708159</u>	A	19980113	WO 93JP1555	A	19931025	199809
			US 95416831	A	19950619	
KR 159072	B1	19981116	KR 95701523	A	19950420	200030
TW 391985	A	20000601	TW 93108812	A	19931022	200060
CA 2147618	C	20010424	CA 2147618	A	19931025	200128
			WO 93JP1555	A	19931025	

Priority Applications (No Type Date): JP 92285802 A 19921023

Cited Patents: EP 335633; JP 2150300; JP 3206900; JP 4228080

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
WO 9410341	A1	J	36	C12Q-001/68	
Designated States (National): AU CA KR US					
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE					
JP 6133798	A		12	C12Q-001/68	
AU 9453445	A			C12Q-001/68	Based on patent WO 9410341
EP 670373	A1	E	22	C12Q-001/68	Based on patent WO 9410341
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK FR GB IT LI NL SE					
JP 2558420	B2		11	C12Q-001/68	Previous Publ. patent JP 6133798
AU 680451	B			C12Q-001/68	Previous Publ. patent AU 9453445
Based on patent WO 9410341					
US 5708159	A		16	C07H-021/04	Based on patent WO 9410341
KR 159072	B1			C12Q-001/68	
TW 391985	A			C12Q-001/68	
CA 2147618	C	E		C12Q-001/68	Based on patent WO 9410341

Abstract (Basic): WO 9410341 A

A probe for diagnosing infections comprises a DNA fragment which hybridises to the fungus DNA. The DNA fragments are generated by an EcoRI digest of DNA from Candida albicans.

USE/ADVANTAGE - The probe is useful for diagnosis of fungal infection. Diagnosis time can be reduced from 3-4 days to 1-2, while maintaining accuracy.

In an example, genomic DNA was isolated from Candida albicans (C.A.-2b) using zymolyase and the Saito-Miura method of isolating by

phenol treatment. The DNA was completely digested by EcoRI and random cloned into the vector pGEM-3Z. The DNA fragment specific to Candida albicans was identified and called CA-2b.

Dwg.0/0

Abstract (Equivalent): US 5708159 A

A probe for diagnosing infections comprises a DNA fragment which hybridises to the fungus DNA. The DNA fragments are generated by an EcoRI digest of DNA from Candida albicans.

USE/ADVANTAGE - The probe is useful for diagnosis of fungal infection. Diagnosis time can be reduced from 3-4 days to 1-2, while maintaining accuracy.

In an example, genomic DNA was isolated from Candida albicans (C.A.-2b) using zymolyase and the Saito-Miura method of isolating by phenol treatment. The DNA was completely digested by EcoRI and random cloned into the vector pGEM-3Z. The DNA fragment specific to Candida albicans was identified and called CA-2b.

Dwg.0/5

Title Terms: PROBE; DETECT; INFECT; DISEASE; COMPRISE; DNA; FRAGMENT;
SPECIFIC; FUNGUS; DISEASE; AGENT; DIAGNOSE; CANDIDA; INFECT

Derwent Class: B04; C07; D16

International Patent Class (Main): C07H-021/04; C12Q-001/68

International Patent Class (Additional): C12N-015/09; C12N-015/11;
C12Q-001/04; G01N-033/566; C12R-001-725

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E05; C04-E05; B04-F09; C04-F09; B11-C08E5;
C11-C08E5; B12-K04A4; C12-K04A4; B12-K04F; C12-K04F; D05-H05; D05-H12D1

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M781 M903 N102 P831 Q233 V753

02 M423 M750 M903 N102 Q233 V500 V550

Chemical Fragment Codes (M6):

03 M903 P831 Q233 R515 R521 R627 R635

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-133798

(43) 公開日 平成6年(1994)5月17日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	7823-4B		
1/04		6807-4B		
// (C 1 2 Q 1/04				
C 1 2 R 1:725)				
		8931-4B	C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数5 (全 12 頁)	

(21) 出願番号 特願平4-285802

(22) 出願日 平成4年(1992)10月23日

(71) 出願人 000238201

扶桑薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番10号

(71) 出願人 592147099

大野 典也

東京都港区北青山3丁目15番16号

(72) 発明者 広津 卓夫

東京都渋谷区元代々木町30-8-304

(72) 発明者 芥子 宏行

東京都北区東十条6-4-4 東十条ス
ンザ102号

(74) 代理人 弁理士 角田 嘉宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 感染症診断用プローブ

(57) 【要約】

【目的】 真菌の検出および同定に有用な感染症起因菌由来のプローブを提供する。

【構成】 *Candida albicans* 菌が保有するDNAを抽出し、抽出したDNAをEcoRI で完全消化し、適当なベクターにクローニングして、それぞれの菌に特有のDNA断片を含むプローブを選抜する。さらに、選抜したプローブの塩基配列を解明する。

【効果】 真菌を特異的に検出し、迅速に同定できる。

解明された塩基配列は、PCR 用プライマー作製のための指針として、また臨床検体に含まれるGenomicDNA との比較参照用に適した標準配列として有用である。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 真菌が保有するDNAと特異的に反応するDNA断片を含む感染症診断用プローブ。

【請求項2】 前記真菌が、カンジダ・アルビカンス (*Candida albicans*) 菌である、請求項1に記載の感染症診断用プローブ。

【請求項3】 前記DNA断片が、カンジダ・アルビカ

*ンス (*Candida albicans*) 菌が保有するDNAを、制限酵素 *EcoRI* および制限酵素 *AvaI* を作用させて調製された切断片である、請求項2に記載の感染症診断用プローブ。

【請求項4】 前記DNA断片が、下記塩基配列 (1)、(2)、および (3) の少なくとも一つの塩基配列を含む、

請求項3に記載の感染症診断用プローブ。すなわち、

- (1) GCGCAAGTCA TCAGCTTGCG TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC GCCCGTCGCT
ACTACCGATT GAATGGCTTA GTGAGGCCTC CGGATTGGTT TAGGAAAGGG GGCAACCTCA
TTCTGGAACC GAGAAGCTGG TCAAACTTGG TCATTAGAG GAAGTAAAG TCGTAACAAG
GTTTCGGTA
- (2) GCTGGGTTTG GTGTTGAGCA ATACGACTTG GGTTCGCTTG AAAGACGGTA GTGGTAAGGC
GGGATCGTTT GACATGGCT TAGGTCTAAC CAAAACATT GCTTGCAGCG GTAACGTCCA
CCACGTATAT CTTCAAACTT TGACCTCAAA TCAGGTAGGA CTACCCGCTG AACTTAAGCA
TATCAATAAG CGGAGGAAAA GAAACCAACA GGGATTGCCT CAGT
- (3) AAACGGATCT CTGTTCTC GCACGGAAT GCGATACGTA ATATGAATTG CAGATATTCG
TGAATCATCG AATCTTGAA CGCACATTGC GCCCTCTGGT ATTCCGGAGG GCATGCCTGT
TTGAGCGTCG TTTCTCCCTC AAACCGCTGG GTTGGTGT GAGCAATACG ACTTGGGTTT
GCTTGAAGA CGGTAGTGGT AAGGCGGGAT CGTTTGACAA TGGCTTAGGT CTAACCAAAA
ACATTGCTTG CGGCGGTAAC GTCCACCACG TATATCTTCA AACTTTGACC TCAAAATCAGG
TAGGACTACC CGCTGAACCT AAGCATATCA ATAAGCGGAG GAAAAGAAAC CAACAGGGAT
TGCTCAGT

【請求項5】 前記DNA断片が、下記塩基配列を含む、※ち、
む、請求項3に記載の感染症診断用プローブ。すなわち※

GAATTCCTAG TAAGCGCAAG TCATCAGCTT GCGTTGATTA CGTCCCTGCC CTTTGTACAC
ACCGCCCGTC GCTACTACCG ATTGAATGGC TTAGTGAGGC CTCGGATTG GTTTAGGAAA
GGGGGCAACC TCATTCTGGA ACCGAGAAGC TGGTCAAAC TGGTCATTGA GAGGAAGTAA
AAGTCGTAAC AAGGTTTCCG TAGTGAACCT GCGGAAGGAT CATTACTGAT TTGCTTAATT
GCACCACATG TGTITTTCTT TGAACAACT TGCTTTGCGG TGGGCCAGC CTGCCGCCAG
AGGTCTAAAC TTACAACCAA TTTTATCA ACTTGTCACA CCAGATTATT ACTTAATAGT
CAAACCTCAA CAAACGGATC TCTGTTCT CGCAGCGAAA TGCGATACGT AATATGAATT
GCAGATATTC GTGAATCATC GAATCTTGA ACGCACATTG CGCCCTCTGG TATCCGGAG
GGCATGCCTG TTTGAGCGTC GTTCTCCCT CAAACCGCTG GGTTCGTTGT TGAGCAATAC
GACTTGGGTT TGCTTGAAAG ACGGTAGTGG TAAGGCGGGA TCGTTTGACA ATGGCTTAGG
TCTAACCAAA AACATTGCTT CGGCGGTAA CGTCCACCAC GTATATCTTC AAATTTGAC
CTCAAATCAG GTAGGACTAC CCGCTGAAC TAAGCATATC AATAAGCGGA GAAAAGAAA
CCAACAGGGA TTGCTCAGT AGCGCGAGT GAAGCGGCAA AAGCTCAAT TTGAAATCTG
CGTCTTTGG CGTCCGAGTT GTAAATTGAA GAAGGTATCT TTGGCCCGG CTCTTGTCTA
TGTTCCCTTG AACAGGACGT CACAGAGGGT GAGAATCCG TCGATGAGA TGACCCGGG

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、真菌感染症疾患起因菌の迅速な検出、同定、および診断に有用なプローブに関する。

【0002】

【従来の技術】 病理学的に、感染とは病原性の微生物 (以下、「菌」と称する) が生体内に侵入し、増殖の足がかりを確立することを指し、生体内での菌の増殖に起因する発症は、宿主の抵抗力と菌の毒力との相互関係に依存するものである。

40 【0003】 感染症の中でも、真菌血症の治療方法、特に、小児癌患者の真菌感染症においては、通常の場合で数日、生体の抵抗力が弱まっている癌の末期段階では一日ないし二日間放置すれば死に至る、という重症かつ緊急な病気であるため、その治療方法の改善は急務とされている。

【0004】 感染症において、生体組織内では第一義的には好中球、単球及びマクロファージ系の食細胞がその防御に働いている。真菌血症での血液中への菌の出現とは、優勢になった菌が食細胞組織から血液中に侵出し

50 たものと考えられる。

3

【0005】菌血症（真菌血症を含む）は菌が血液中に侵出した状態であり、治療においては、起因菌に感受性のある抗生物質を大量に投与する。ところが、抗生物質は一般に肝臓など臓器の機能を低下させるため、有効でない抗生物質を危険な状態にある患者に投与することは極力避けなければならない。

【0006】一般に、細胞の食菌力が菌の毒力に及ばず、菌が全身の血流中に拡がる場合を菌血症（bacteremia）と定義すれば、菌の産生する毒素の働きで、重い症状を示す菌血症を敗血症（sepsis）と称する。そして、sepsisの証明、すなわち診断の確立には、①臨床症状、②検体の培養、③検体に含まれる菌のグラム染色、及び④ショック状態の確認が必須であり、これらの項目が確認されて初めて治療方針が決定される。したがって、臨床現場においては、迅速かつ確実な菌の同定が望まれているのである。

【0007】検査室での菌血症を疑われた検体の菌の検出・同定方法としては、カルチャー・ボトル法で陽性の検体に限って、選択培地を用いて同定が行われるのが一般的な手順である。しかしながら、実際にはこれら血液検体からの菌の培養の成功率は極めて低く、しかも、菌血症を疑われた時点で、大量に抗生物質を投与されている場合には、たとえ血液中に菌が含まれていても、増菌・増殖できない場合が多く、それ故、カルチャー・ボトル法で陽性になる割合は極めて少ない。

【0008】さらに、サブルーチンとしての方法に、菌体成分や菌の代謝産物の機器分析法（辨野義己、「ガスクロマトグラフィーによる細菌同定の迅速化」、臨床検査、vol. 29, No. 12, 1985年11月、医学書院参照）、特異抗体を利用した方法（日本特許出願公開60-224068号参照）、さらには、DNAの特異性を利用したハイブリダイゼーションによる方法（特許出願公表61-502376号）等があるが、いずれも、菌の分離及び増菌培養を必須とされている。

【0009】一方、感染症における食細胞の機能に着目したものと、血液試料中の白血球成分が集中しているパフィーコート（Buffy coat）の塗抹染色標本を鏡検する方法がある。一般にパフィーコート標本で菌が検出される頻度は、成人菌血症では耳朶血の頻度と同様に30%程度にとどまるが、新生児の場合、10例中7例（70%）で菌を検出している報告もあり、塗抹標本の鏡検により末梢血中菌の有無に関する情報は治療における大きな指針となっている。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】上記従来技術においては、その前処理操作として、少なくとも検体からの菌の選択的分離に1～2日、増菌に1日、固定操作に1日以上、合計で3～4日は十分かかり、現実にはこの培養を菌が発育するまで続けることになるので、カルチャー・ボトル法で陽性になった場合ですら、前処理操作に一週

4

間以上要する場合が多く、これがカルチャー・ボトル法で陽性を示した患者の死亡率を押し上げる要因になっている。例えば、「感染症学雑誌」、vol. 58, No. 2, p. 122, 1984年には、血液培養陽性率が28.6%（163/569件）でも、その内死亡率が84.6%（138/163件）にまで到っている旨が報告されている。

【0011】さらに、菌の培養時に疾患の原因菌以外の菌が混入しても区別できない場合もある。例えば、菌血症の起因菌の一つの表皮ブドウ球菌（*Staphylococcus epidermidis*）は、正常人の皮膚にも存在する菌であり、注射針を皮膚に刺す時にこの菌を取り込んで検体中に混入する虞もある。

【0012】そして重要なことは、前述した事情から、培養すべき検体中の多くの菌は食細胞に取り込まれ、抗生物質投与のため死んでいるか静止状態にあるため、培養条件下でも増殖できる菌の数は少なく、臨床検体を用いた培養による実際の菌の検出率は10%前後と、非常に低い。換言すれば、臨床的に菌血症を疑われた患者の血液をさらに一昼夜以上培養して検査しても結局、その90%は菌の存在すら判明しないのが現状である。

【0013】すなわち、菌血症においては、その感染症が、細菌あるいは真菌のいずれによるものか不明な場合が多く、また、その原因菌の種別により、抗生物質等の治療方法も大きく異なる。このような状況から、現在は臨床的に真菌血症を疑った段階で、検出結果が出るのを待たずに治療、すなわち、最も広範囲な種類の菌に有効な抗生物質を投与し、1、2日間様子を見て、効果が現れないと別の抗生物質に切換えるという試行錯誤的な方法に頼っているのである。

【0014】また、検体中の菌を染色により検出する方法では、生体成分も菌と同様に染色されるため、鏡検して認められる形態によってのみ迅速に菌を判別するのは、熟練が必要であり、判定が困難な場合もある。

【0015】このように、迅速・確実な診断が求められる疾患であるにもかかわらず、従来の診断方法では十分対応できていなかったのが実情である。

【0016】

【課題を解決するための手段】本発明は上記当該技術分野が抱えている課題に鑑みて完成されたものであり、その要旨とするところは、細菌由来ではなく、*Candida albicans* 菌をはじめとする広範な真菌感染症起炎菌が保有するDNA またはRNA と特異的な反応性を有するプローブであり、さらに、そのプローブが有するDNA の塩基配列を解明することにある。

【0017】また、これらのプローブの塩基配列情報を参照してプライマーをデザインすれば、ハイブリダイゼーションを行わなくとも、PCR 法によるDNA の増幅により、感染症原因菌を同定することができる。

【0018】また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブを非放射性のもの、例えば、ビオチン化したプロ

ープを用いれば、放射性同位元素使用施設のない一般検査室でも検出でき、検出作業が迅速、簡便に行える。

【0019】以下に、*Candida albicans* 菌由来するプローブの実施例を示す。

【0020】

【実施例】

実施例1: *Candida albicans* 菌由来DNAプローブ

(1) *Candida albicans* 菌由来DNAの選抜

臨床菌株 *Candida albicans* (C.A.-26) を、サブロー培地で一晚培養し、培養菌体を集菌して、リゾチームの代わりにザイモリエイス (生化学工業) を加えた上で、Saito-Miura法 ("Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment", Biochem. Biophys. Acta vol. 72, pp. 619-629 (1963)) に従って、Genomic DNA を抽出した。

【0021】抽出したDNAを、制限酵素 *EcoRI* で完全消化し、ベクター pGEM-3Z にランダムクローニングし、得られたクローンから *Candida albicans* 特有のDNA断片を選抜した。

【0022】そして選抜されたDNA断片を CA-26 と命名し、その制限酵素地図を図1に示した。

【0023】(2) *Candida albicans* 菌由来DNAプローブの種特異性の検定

上記実施例1(1)で選抜したDNA断片と各種感染症原因菌株が保有するDNAとの反応性を、以下の方法により検討した。

【0024】まず、検討対象菌株 (全31種) の臨床菌株を準備した。

【0025】次に、各臨床菌株を実施例1(1)に記載の方法に従って、そのDNAを抽出し、この抽出したDNAの一定量 (0.5 μ g/ μ l) を、Byodyne ナイロンフィルター

(type B) にスポットし、風乾し、0.5N NaOH-1.5M NaCl で10分間アルカリ変性し、0.5M Tris-Cl (pH 7.5)-1.5M NaCl で10分間中和し、1% SSC で5分間洗浄し、そして風乾したものを、ドット・プロット・ハイブリダイゼーションの試料とした。そして、DNA labeling and detection kit (Cat. No. 1175033: Boehringer Mannheim Biochemica) に従い、ジボキシゲニン-dUTP でラベルした *Candida albicans* 菌由来のDNAをプローブとして、マニアティスのマニュアル (Maniatis, et al., "Molecular Cloning (A Laboratory Manual)", Cold Spring Harbour Laboratory (1982)) に従い、45%ホルムアミド、5×SSC、42℃の条件下で、2時間、前ハイブリダイゼーションした後、同じく42℃の条件下で、終夜ハイブリダイゼーションを実施した。

【0026】終夜ハイブリダイゼーションを終えた試料を、50℃にて1×SSC、0.1% SDSによる20分間の洗浄を2回行い、2%ブロッキング試薬 (Skim milk: 雪印) を30分間反応させ、約5mlの抗体結合希釈溶液 (150mU/ml (1:5000)) でフィルターを、30分間、インキュベートし、50ml緩衝液 (0.1M Tris-Cl (pH 7.5), 0.15M NaCl) で15分間の洗浄を2回行って抗体未結合体を除去し、10mlのA.P. 9.5で2分間、膜を平衡化し、プラスチック・バッグで密閉したフィルターを、10mlのNBT/BCIP (BR L) でインキュベートし、検出・発色させ、そして、30mlのTE緩衝液で、10分間、膜を洗浄することによって反応を停止した。

【0027】本発明のプローブと各臨床菌株由来のDNAとのハイブリダイゼーション反応性に関する実験結果を、下記表1に示した。

【0028】

【表1】

7 細菌名	反応性	8 真菌名	反応性
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	<i>Candida albicans</i> (40083)	+
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	-	<i>Candida albicans</i> (40084)	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Candida albicans</i> (40107)	++
<i>Escherichia coli</i>	-	<i>Candida albicans</i> (7N)	++
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i> (1623)	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Candida albicans</i> (臨床分離株)	++
<i>Streptococcus sanguis</i>	-	<i>Candida krusei</i>	++
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	<i>Candida tropicalis</i>	++
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	-	<i>Candida parapsilosis</i>	++
<i>Pseudomonas diminuta</i>	-	<i>Candida guilliermondii</i>	+
<i>Pseudomonas putida</i>	-	<i>Aspergillus fumigatus</i> (0063)	-
<i>Pseudomonas alcligenes</i>	-	<i>Aspergillus flavus</i>	-
<i>Enterococcus agglomerans</i>	-	<i>Cryptococcus neoformans</i> (0354)	-
<i>Haemophilis parainfluenzae</i>	-	<i>Mucor spinosus</i> (1322)	-
<i>Haemophilis influenzae</i>	-		
<i>Haemophilis haemolyticus</i>	-		
<i>Haemophilis parahaemolyticus</i>	-		

++ : ハイブリダイズのシグナルを顕著に検出

+ : ハイブリダイズのシグナルを検出

- : ハイブリダイズのシグナルは検出されず

【0029】上記表1から明らかなように、本発明のプロブは、多くの真菌類由来のDNAにのみ特異的に反応し、細菌由来のDNAとは交差しないことが判明し、その真菌特異性が確認された。

【0030】実施例2：塩基配列の解析

実施例1で真菌に対する特異性が確認されたDNAプロブの塩基配列を下記の方法に従って決定した。

【0031】(1) プラスミドDNAの調製

サブクローンされた(塩基配列を決定すべき)挿入断片を pGem-3Z (Promega)に含んだ*Escherichia coli* K-12, JM109形質転換体を、5mlの Luria-BactaniMedium (bacto-tryptone, 10g/L; bacto-yeast extract, 5g/L; NaCl, 10g/L; 5N NaOH でpH 7.0に調整)に植菌し、一晚培養した。

【0032】培養液を遠心分離(5,000rpm, 5min.)して集菌した。沈澱物に2.5mg/mlの濃度でリゾチーム(Sigma)を含む 50mM グルコース/50mM Tris-HCl(pH8.0)/10mMEDTA 溶液を 100μl 加え、室温で5分間放置した。

得られた懸濁液に1%の濃度でドデシル硫酸ナトリウム(Sigma)を含む 0.2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて混合した。5M酢酸カリウム水溶液(pH4.8) 150μl をさらに加えて混合し、15分間氷冷した。

【0033】そして、遠心分離(15,000rpm, 15min.)して得た上清を、フェノール/CHCl₃処理し、上清に2倍量のエタノールを加え、さらに遠心分離(12,000rpm, 5min.)して沈澱を得た。この沈澱物を、10mM Tris-HCl(pH7.5)/0.1mM EDTA溶液 100μl に溶解し、10mg/ml RNaseA (Sigma)溶液を加え、室温で15分間放置した。

【0034】この調製物に 0.1M 酢酸ナトリウム水溶液(pH4.8)を 300μl 加え、フェノール/CHCl₃処理し、上

清にエタノールを加えて沈澱を得た。この沈澱物を乾燥し、10μl の蒸留水に溶解したものをDNA試料とした。

【0035】(2) 塩基配列決定の前処理

塩基配列決定の前処理を AutoRead(登録商標) Sequencing Kit (Pharmacia)を用いて行った。

【0036】すなわち、鋳型となるDNAが32μl 溶液中に5~10μg の濃度になるように調整した。1.5mlのミニチューブ(エッペンドルフ)に、鋳型DNA 32μl を移し、2M水酸化ナトリウム水溶液を8μl 加えて穏やかに混合した。そして、軽く遠心した後、室温で10分間放置した。

【0037】3M酢酸ナトリウム(pH4.8) 7μl と蒸留水4μl を加え、さらにエタノールを 120μl 加えて混合し、ドライアイス上で15分間放置した。そして、15分間遠心分離して沈澱したDNAを集め、注意しながら上清を除去した。得られた沈澱物を70%エタノールで洗浄し、10分間遠心分離した。そして、注意しながら再度上清を除去し、減圧条件下で沈澱物を乾燥した。

【0038】沈澱物を蒸留水10μl に溶解し、蛍光性のプライマー (Fluorescent Primer, M13 Universal Primer; 5'-Fluorescein-d CGACGTTGTAACGACGGCCAGT -3' (1.6pmol/μl; 0.42 A₂₆₀ unit/ml); M13 Reverse Primer, 5'-Fluorescein-d CAGGAACAGCTATGAC -3' (2.1pmol/μl; 0.42 A₂₆₀ unit/ml)) 2μl (0.42 A₂₆₀ unit/ml, 4~6pmol) とアニーリング用緩衝液2μl を加え穏やかに混合した。

【0039】そして、軽く遠心した後、65℃で5分間熱処理を行い、素早く37℃条件下に置き、そこで10分間保温した。保温後10分以上室温で放置し、軽く遠心し

た。そして、延長用緩衝液1 μ l とジメチルスルホキシド3 μ l を加えたものを試料とした。

【0040】4本のミニチューブにA、C、GおよびTと記入し、それぞれのチューブにAMix (ddATPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)、C Mix (ddCTPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの)、G Mix (ddGTPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの) およびT Mix (ddTTPをdATP、dCTP、c' dGTPおよびdTTPと共に溶解したもの) を2.5 μ l ずつ分注した。なお、それぞれの溶液は使用時まで

は氷中で保存し、使用時には37℃で1分間以上保温してから使用した。

【0041】希釈したT7DNA ポリメラーゼ (Pharmacia; 6~8 units/2 μ l) 2 μ l をDNA 試料に加え、ピペッティングもしくは穏やかな混合により、完全に混合した。

混合後すぐに、この混合液を4.5 μ l ずつ保温しておいた4種の溶液に分注した。

【0042】なお、分注に際しては新しいチップを用いた。

【0043】37℃で5分間保温し、停止溶液を5 μ l ずつそれぞれの反応液に加えた。

【0044】この分注においても、新しいチップを用いた。90℃で2~3分間保温し、すぐに氷中で冷却した。電気泳動には1レーンあたり4~6 μ l を泳動した。

【0045】(3) 塩基配列の決定

実施例1に開示したCandida albicansに対して特異性を有するプローブの、塩基配列の決定を、泳動温度45℃、泳動時間6時間として、A.L.F. DNA Sequencerシステム (Pharmacia) を用いて行った。その結果、カンジダ・アルビカンスCA-26の全塩基配列 (配列番号1) が明らかとなった。

【0046】さらに、この全塩基配列の詳細を検討し、下記実施例3におけるプローブの基礎 (Template DNA) となる、該全配列に含まれる3つの配列部位 (配列番号2、3および4) を選択した。

【0047】

実施例3: PCR 法による Template DNA の増幅

(1) 試薬の混合

下記の試薬を、①~⑤の順に従って混合して、調製した。

【0048】① 10倍希釈緩衝液: 2 μ l

② 0.5nM のdATP、dCTP、dGTP、およびdTTP: 各1 μ l

③ オリゴヌクレオチド・プライマー No.14 (20mer: 配列番号5): 2 μ l

オリゴヌクレオチド・プライマー No.17 (20mer: 配列番号6): 2 μ l

④ Template DNA: 5ng/2 μ l

⑤ Taq polymerase (Cetus): 1.25U/0.25 μ l

(2) Template DNAの増幅

上記調製済試薬およびDNA 増幅機器 (商品名「BiGene P HC-1」 Techne社製) を用いて、Template DNAの増幅を行った。

【0049】なお、該増幅機器の温度コントロールは、熱変性を94℃・1分間、プライマーのアニーリングを62℃・1分間、および相補鎖の合成を74℃・1分間に、それぞれ設定し、この反応サイクルを30回繰り返した。

【0050】(3) ハイブリダイゼーション法によるTemplate DNAと細菌DNA との特異性の検定

① 配列番号2の塩基配列を有するTemplate DNAの増幅により得られた生成物10 μ l を、2%アガロース・ゲル (Seakern GTG Agarose) 上に置き、エチジウムブロマイド染色し、0.5N NaOH-1.5M NaCl で30分間洗浄してアルカリ変性し、0.5M Tris-Cl (pH 7.5)-1.5M NaCl で10分間中和し、Byodyne ナイロンフィルター (type B) に移して12時間置き、そして風乾したものを、サザーン・ハイブリダイゼーションの試料とした。そして、(図2および3のレーン番号と対応させて表示してある) 下記表2に示した各種真菌類および細菌類の GenomicDNA に対して、45%ホルムアミド、5 \times SSC、42℃の条件下で、2時間、前ハイブリダイゼーションした後、同じく42℃の条件下で、終夜ハイブリダイゼーションを行った。なお、プローブの3'末端には、20mer のオリゴヌクレオチドを、DIG Oligonucleotide 3'-Endo Labeling Kit (Cat. No. 1362372: Boehringer Mannheim Biochemica) に従ってラベルしたものをを用いた。

【0051】

【表2】

11		12	
No.	真 菌 名	No.	細 菌 名
1	<i>Candida albicans</i> (40083)	16	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Candida albicans</i> (40084)		(ATCC 25923)
3	<i>Candida albicans</i> (40107)	17	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4	<i>Candida albicans</i> (7N)	18	<i>Escherichia coli</i>
5	<i>Candida albicans</i> (1623)		(ATCC 25922)
6	<i>Candida albicans</i> (臨床分離株)	19	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
7	<i>Candida guilliermondii</i>	20	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8	<i>Candida krusei</i>		(ATCC 27853)
9	<i>Candida parapsilosis</i>	21	<i>Haemophilis influenzae</i>
10	<i>Candida tropicalis</i>		
11	<i>Cryptococcus neoformans</i> (0354)	注：分子量マーカー（両端レーン）として、pBR328[BglI-HincII] ベーリンガーを、用いた。	
12	<i>Aspergillus flavus</i> (0057)		
13	<i>Aspergillus fumigatus</i> (0063)		
14	<i>Mucor spinosus</i> (1322)		
15	<i>Absidia corymbifera</i> (2435)		

【0052】終夜ハイブリダイゼーションを終えた試料を、50℃にて1×SSC、0.1%SDSによる10分間の洗浄、および50℃にて0.5×SSC、0.1%SDSによる10分間の洗浄を行い、風乾した後、-40℃の条件下に終夜置いた。

【0053】図2に示した電気泳動図から明らかなように、配列番号2の塩基配列を有するTemplate DNAから調製したプローブの、真菌類が保有するGenomic DNAとの反応性が確認された。

【0054】② 同様に、配列番号3の塩基配列を有するTemplate DNAの増幅により得られた生成物10μlを用いて、上記①に記載の方法に従い、サザン・ハイブリダイゼーションを行い、その結果を図3に示した。 *

* 【0055】その結果、配列番号3の塩基配列を有するTemplate DNAから調製したプローブでは、細菌類には全く反応性を示さず、真菌由来のGenomic DNAに対してのみ反応性を示した。

【0056】③ 次に、配列番号4の塩基配列を有するTemplate DNAの増幅により得られた生成物10μlから、上記①に記載の方法に従い、サザン・ハイブリダイゼーション用の試料を調製し、（図4のレーン番号と対応させて表示してある）下記表3に示した各種真菌類および細菌類のGenomic DNAに対して、ハイブリダイゼーションを実施した。

【0057】

【表3】

No.	真 菌 名	No.	細 菌 名
1	<i>Candida albicans</i> (40083)	13	<i>Staphylococcus aureus</i>
2	<i>Candida albicans</i> (40084)		(ATCC 25923)
3	<i>Candida albicans</i> (40009)	14	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
4	<i>Candida guilliermondii</i> (臨床分離株)		(ATCC 12228)
5	<i>Candida krusei</i> (臨床分離株)	15	<i>Escherichia coli</i>
6	<i>Candida parapsilosis</i> (臨床分離株)		(ATCC 25922)
7	<i>Candida tropicalis</i> (臨床分離株)	16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	<i>Cryptococcus neoformans</i> (0354)		(臨床分離株)
9	<i>Aspergillus flavus</i> (0057)	17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	<i>Aspergillus fumigatus</i> (0063)		(ATCC 27853)
11	<i>Mucor spinosus</i> (1322)	18	<i>Enterobacter agglomerans</i>
12	<i>Absidia corymbifera</i> (2435)		(臨床分離株)
		19	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
			(HYSDB DP-2)
		20	<i>Streptococcus faecalis</i>
			(ATCC 29212)
		21	ヒト genomic DNA

注：分子量マーカー（両端レーン）として、φX174/HaeIII を、用いた。

【0058】その結果、配列番号4の塩基配列を有するTemplate DNAから調製したプローブにおいても、*Candida* 属細菌由来のGenomic DNA に対する特異的反応性が確

認された（図4）。

【0059】④ 最後に、本発明のプローブの検出感度ならびにヒトGenomic DNA に対する交差性に関して検定

を行った。

【0060】すなわち、配列番号2の塩基配列を有する Template DNAの増幅により得られた生成物10 μ l から、上記①に記載の方法に従い、サザン・ハイブリダイゼーション用の試料を調製し、(図5のレーン番号と対応させて表示してある)下記表4に示した各種濃度に調製*

No.	真 菌 名
1	Candida albicans (50ng)
2	Candida albicans (25ng)
3	Candida albicans (10ng)
4	Candida albicans (5ng)
5	Candida albicans (1ng)
6	Candida albicans (0.5ng)
7	Candida albicans (0.1ng)
8	Candida albicans (0.05ng)
9	Candida albicans (0.01ng)
10	Candida albicans (5pg)
11	Candida albicans (1pg)

【0062】図5に示した結果より、本発明のプロープのプロープでは、5pg/ μ l という希薄な濃度でもCandida albicansの Genomic DNAを検出でき、さらに、ヒト Genomic DNAに対して交差性を有さないことが判明した。

【0063】

【発明の効果】本発明のプロープを用いれば、真菌を増殖することなく直接検出し、かつ菌を迅速にしかも正確に同定できる。すなわち、本発明のプロープを用いた診断では、1回分の検体で真菌の同定まで行え、診断に要する時間も従来法の3~4日(検出される率は低い)から、約1~2日と飛躍的に短縮でき、しかもその検出率は格段と高い。それ故、真菌血症の治療に対して画期的な指針を与えるばかりでなく、感染症患者に早期の内に有効な治療が実施でき、ひいては死亡率の低減も期待される。

【0064】また、真菌血症起炎菌の中でも、特に発症頻度の高い、Candida albicansに特異的に反応するプロープの塩基配列を明らかにしたことにより、これらプロープを人工的に調製することを可能とした。

【0065】さらに、臨床検体に含まれるGenomic DNAの塩基配列と本発明によって解析された塩基配列とを比較参照することにより、感染症原因菌種の迅速な同定が行える。

【0066】上記したように、本発明は、所期の目的であった、真菌に特異的な診断用プロープを提供するのみならず、PCR用プライマー作製の指針として、また臨床検体に含まれるGenomic DNAとの比較参照用に適した標

配列

GAATTCCTAG TAAGCGCAAG TCATCAGCTT GCGTTGATTA CGTCCCTGCC CTTTGTACAC 60
 ACCGCCCGTC GCTACTACCG ATTGAATGGC TTAGTGAGGC CTCGGATTG GTTTAGGAAA 120
 GGGGGCAACC TCATTCTGGA ACCGAGAAGC TGGTCAAACT TGGTCATTTA GAGGAAGTAA 180

*したCandida albicansの Genomic DNA、及び4名の健康な成人男子の白血球由来のヒト Genomic DNAに対して、ハイブリダイゼーションを実施した。

【0061】

【表4】

No.	細 菌 名
12	Candida albicans (40083)
13	ヒト genomic DNA 1
14	ヒト genomic DNA 2
15	ヒト genomic DNA 3
16	ヒト genomic DNA 4

注：分子量マーカー(両端レーン)として、pBR328[BglI-HincII]ベクターを用いた。

準配列として優れた有用性が期待され、さらには真菌血症起炎菌に特異的に反応するプロープの今後の探究・開発における貴重な手がかりをもたらす等の優れた効果を奏するものである。

【0067】また、本願出願にて開示した塩基配列は、臨床分離株のGenomic DNAをランダムにクローニングして得られたものであり、それ故、本発明の塩基配列の有用性はその相補鎖にまで及ぶものである。

【0068】さらに、野性株が保有するDNAに変異部分が存在することは当然考えられるが、上記実施例の開示から明らかなように、当該DNA変異部分が、Candida albicansが原因する感染症診断のためのハイブリダイゼーションへ利用する際の本発明プロープの特異性、あるいは本願出願にて開示した塩基配列情報を感染症の迅速診断を目的としたPCR法のプライマーをデザインするために利用できる等の、本発明が奏する有用性には何ら影響を与えるものではない。

【0069】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：899

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源

生物名：カンジダ 7株カス (Candida albicans)

株名：臨床分離株 CA-26

15	16
AAGTCGTAAC AAGGTTTCG TAGTGAACCT GCGGAAGGAT CATTACTGAT TTGCTTAATT	240
GCACCACATG TGTITTTCTT TGAACAAACT TGCTTTGCGG TGGGCCCAGC CTGCCGCCAG	300
AGGTCTAAAC TTACAACCA TTTTITATCA ACTTGTACA CCAGATTATT ACTTAATAGT	360
CAAACTTCAA CAAACGGATC TCTTGGTTCT CGCAGCGAAA TCGGATACGT AATATGAATT	420
GCAGATATTC GTGAATCATC GAATCTTTGA ACGCACATTG CGCCCTCTGG TATTCGGGAG	480
GGCATGCGTG TTTGAGCGTC GTTCTCCCT CAAACCGCTG GGTITGGTGT TGAGCAATAC	540
GACTTGGGTT TGCTTGAAG ACGGTAGTGG TAAGCGGGA TCGTTTGACA ATGGCTTAGG	600
TCTAACCAAA AACATTGCTT GCGCGGTAA CGTCCACCAC GTATATCTTC AAACCTTGAC	660
CTCAATCAG GTAGGACTAC CCGCTGAAT TAAGCATATC AATAAGCGGA GAAAAAGAA	720
CCAACAGGA TTGCCTCAGT AGCGCGGAGT GAAGCGGCAA AAGCTCAAAT TTGAAATCTG	780
GCGTCTTTGG CGTCCGAGTT GTAATTTGAA GAAGGTATCT TTGGGCCCGG CTCTTGCTA	840
TGTTCTTGG AACAGGACGT CACAGAGGGT GAGAATCCCG TCGATGAGA TGACCCGGG	899

配列番号: 2

配列の長さ: 189

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

* 配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: カンジダ アルビカンス (Candida albicans)

株名: 臨床分離株 CA-26

*

配列

GCGCAAGTCA TCAGCTTGGC TTGATTACGT CCCTGCCCTT TGTACACACC GCCCGTCGCT	60
ACTACCGATT GAATGGCTTA GTGAGGCTC CGGATTGGTT TAGGAAAGGG GGCAACCTCA	120
TTCTGGAACC GAGAAGCTGG TCAAACTTGG TCATTAGAG GAAGTAAAG TCGTAACAAG	180
GTTTCCGTA	189

配列番号: 3

配列の長さ: 224

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

※配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: カンジダ アルビカンス (Candida albicans)

株名: 臨床分離株 CA-26

※

配列

GCTGGGTTTG GTGTTGAGCA ATACGACTTG GGTITGCTTG AAAGACGGTA GTGTAAGGC	60
GGGATCGTTT GACAATGGCT TAGGTCTAAC CAAAACATT GCTTGC GGCG GTAACGTCCA	120
CCACGTATAT CTCAAACCTT TGACCTCAAA TCAGGTAGGA CTACCGCTG AACTTAAGCA	180
TATCAATAAG CGGAGGAAAA GAAACCAACA GGGATTGCCT CAGT	224

配列番号: 4

配列の長さ: 369

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

★配列の種類: Genomic DNA

起源

生物名: カンジダ アルビカンス (Candida albicans)

株名: 臨床分離株 CA-26

★

配列

AAACGGATCT CTTGGTCTC GCAGCGAAAT GCGATACGTA ATATGAATTG CAGATATTCG	60
TGAATCATCG AATCTTTGAA CGCACATTGC GCCCTCTGGT ATTCCGGAGG GCATGCCTGT	120
TTGAGCGTCG TTTCTCCCTC AAACCGCTGG GTTTGGTGT GAGCAATACG ACTTGGGTTT	180
GCTTGAAAGA CGGTAGTGGT AAGGCGGGAT CGTTTGACAA TGGCTTAGGT CTAACCAAAA	240
ACATTGCTTG CGGCGGTAAC GTCCACCACG TATATCTTCA AACTTTGACC TCAATCAGG	300
TAGGACTACC CGCTGAACCT AAGCATATCA ATAAGCGGAG GAAAAGAAAC CAACAGGGAT	360
TGCCTCAGT	369

配列番号: 5

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

アンチセンス: No

配列

(10)

特開平6-133798

17

18

GACAATGGCT TAGGTCTAAC.

20

配列番号: 6

配列の長さ: 20

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

* トポロジ: 直鎖状

配列の種類: 他の核酸 合成DNA

アンチセンス: Yes

*

配列

TCATCTCATC GCACGGGATT

20

【図面の簡単な説明】

【図1】 *Candida albicans* 菌検出用プローブの *EcoRI* 断片の制限酵素地図である。

【図2】 配列番号2の塩基配列を含むプローブと各種真菌ならびに細菌由来のGenomicDNA に対する反応性を示す電気泳動図である。

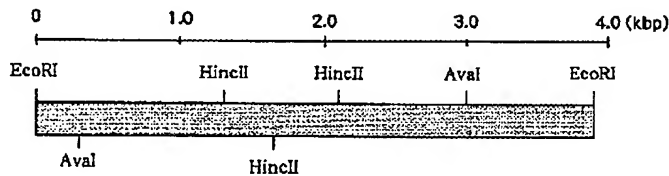
【図3】 配列番号3の塩基配列を含むプローブと各種真菌ならびに細菌由来のGenomicDNA に対する反応性を示す電気泳動図である。

す電気泳動図である。

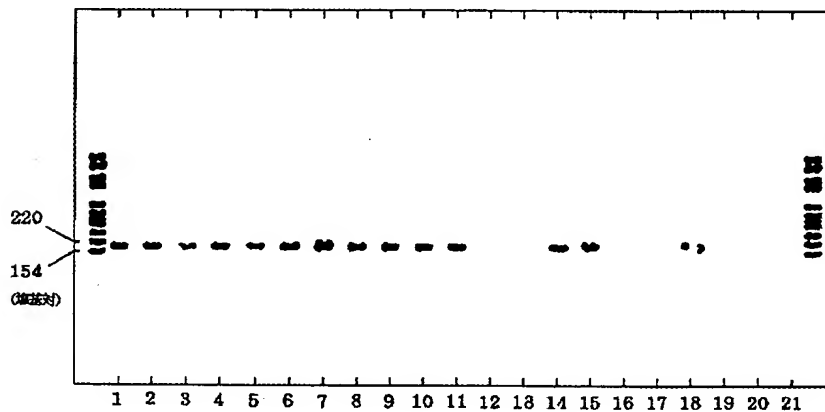
【図4】 配列番号4の塩基配列を含むプローブと各種真菌ならびに細菌由来のGenomicDNA に対する反応性を示す電気泳動図である。

【図5】 配列番号2の塩基配列を含むプローブと各種濃度の *Candida albicans* 菌ならびにヒト由来のGenomic DNA に対する反応性を示す電気泳動図である。

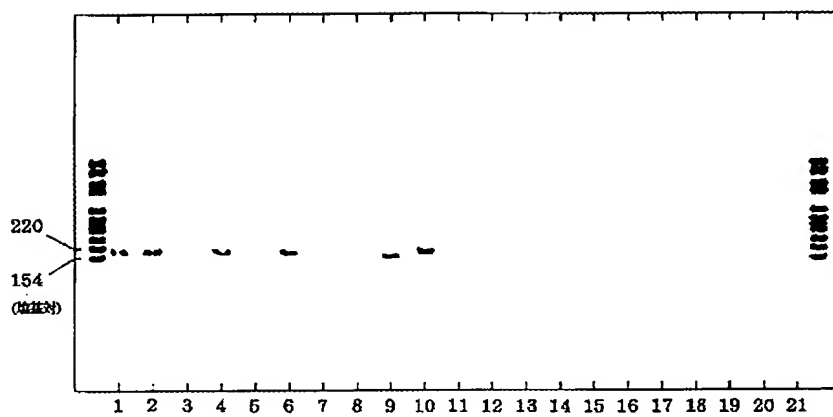
【図1】



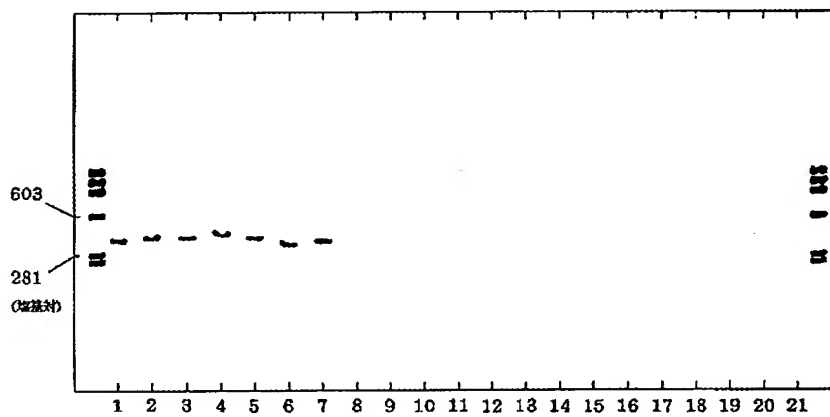
【図2】



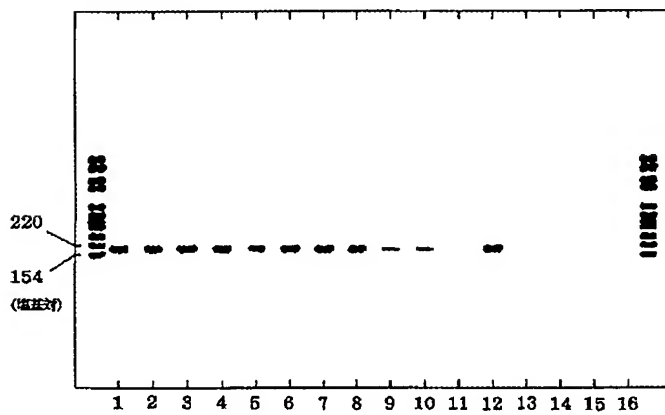
【図3】



【図4】



【図5】



(12)

特開平6-133798

フロントページの続き

(72)発明者 松久 明生

奈良県奈良市右京2丁目1-2の32-504

(72)発明者 大野 典也

東京都港区北青山3丁目15番16号